

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 481号	学位授与年月日	平成22年11月19日
氏 名	井 上 菜 穂 子		
論文題目	A new lipidomics approach by thin-layer chromatography-blot-matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for analyzing detailed patterns of phospholipid molecular species (薄層クロマトグラフィーブロットマトリクス支援脱離レーザーイオン化法によるリン脂質の詳細な分子種解析を行う新しいリポドミクス手法)		

博士(医学) 井上 菜穂子

論文題目

A new lipidomics approach by thin-layer chromatography-blot-matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for analyzing detailed patterns of phospholipid molecular species

(薄層クロマトグラフィーブロットマトリクス支援脱離レーザーイオン化法によるリン脂質の詳細な分子種解析を行う新しいリポミクス手法)

論文の内容の要旨

[はじめに]

脂質分析に広く汎用されている手法には高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (TLC)、核磁気共鳴、質量分析法 (MS) などが挙げられる。その中でも特に最も感度が高いことから、MS が広く利用されている。脂質分析に用いられる質量分析法としては、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) とエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) の二種類が存在する。それぞれに長所・短所が存在するが、MALDI は夾雑物が混在している状態でもイオン化可能である点と、繰り返し測定が可能な点において、ESI と比べて優位である。

一方、この MALDI の手法を応用したイメージングマスマススペクトロメトリー (IMS) と呼ばれる表面分析法が注目されている。IMS は主に凍結切片を対象としてレーザーにより生体分子の局在情報を保ったままイオン化することで、標識等なしに生体分子の局在情報を明らかにできる手法である。脂質の局在情報についてはこれまで抗体染色法を用いて解析が進められてきた。しかし用いられる抗体は脂質の部分構造のみを認識するものであり、結合している脂肪酸鎖長の異なる詳細な分子種を個々に可視化することはできなかった。IMS は質量を用いて可視化するため、これまで可視化できなかった脂質の詳細な分子種を個々に可視化できる手法として、特に注目を浴びている。しかし、脂質が混合物として存在している場合、ホスファチジルコリン (PC) のみが極性基を持つことからイオン化が著しく高くなり、その結果他の生体分子が検出しにくくなるという現象が起こる。この現象を改善するためには、やはりリン脂質をある程度分離したうえで解析する事が望まれる。

TLC は古くから汎用されてきた脂質分離の手法であり、簡便かつ安価に分析する事が出来る手法である。リン脂質についてもそれらを官能基ごとに分離することが可能である。しかし、非常に詳細な差である脂肪酸鎖長の違いによって個々に可視化する事はできない。またその感度についても決して高感度とは言えない。

そこで我々は、高感度な検出が可能である MS と、簡便に脂質を分離可能な TLC、更には質量ごとに局在を可視化する IMS を結合させた、TLC-Blot -MALDI-IMS の手法について検討を行った。

[材料ならびに方法]

標品の PC は和光純薬から購入した。使用した溶媒はすべて最高純度のものを使用した。ヒト脳脂質抽出物は Netherlands Brain Bank (NBB) より得たものを、常法に従い総脂質を抽出し、TLC にて展開した。展開後のプレートはブリムリン染色で発色を確認した。TLC プレートはレーザー照射時にシリカがイオン源を汚染するため TLC-Blot の手法を用いて PVDF 膜へ転写した。転写した PVDF 膜を質量分析計用プレートに貼付し、IMS を行った。測定後は BioMap software (Novartis)

を用いて各質量の画像を再構築した。

[結果]

まず、標品を用いて TLC-Blot-MALDI-IMS における検出限界を調べた。その結果、従来のプリムリン染色法での検出限界と比較し、TLC-Blot-MALDI-IMS は 10 倍程度高感度であった。更に濃度依存的直線性も確認できたことから比較定量が可能であるということが分かった。次にヒト脳より抽出した脂質を TLC で展開し、得られたスフィンゴミエリン (SM) に該当するバンドの測定を行った。プリムリン染色の結果は脳の白質と比較して、SM の量は白質に多いことを示した。さらに TLC-Blot-MALDI-IMS の手法を用いて解析した結果、SM の分子種ごとに異なる挙動を示していることを明らかにした。具体的には、SM (d18:1/C24:1) は白質で有意に多く ($p < 0.001$) 含有されているのに対し、SM(d18:1/C20:0) は逆に灰白質で有意に多く ($p < 0.05$) 含有されているという新規知見を得た。

[考察]

これまでの TLC はプリムリンのような化学発色検出法を用いており、ナノグラム以下の検出は困難であった。一方、質量分析計の装置改善により、MS による検出は近年著しい感度上昇がみられた。そのため、TLC-Blot-MALDI-IMS では従来の TLC での検出限界を超える高感度な解析手法として確立することができた。またこれまで TLC では分離困難であった脂質の脂肪酸鎖長による分子種をそれぞれ個々に可視化できることから、総量としては変化がみられない脂質であっても、分子種による変化を可視化し、新規知見を得ることができるようになった。ヒト脳の場合、白質には神経軸索が存在し、その軸索を被覆しているミエリン鞘の構成成分として SM が含まれることを反映し、白質には灰白質に比べて SM 含有量が多い。しかし、TLC の結果だけでは SM のどの分子種が変化しているのかを知ることはできない。我々が開発した手法を用いれば、どのような分子種が増えているのか、また逆相関をもつような脂質分子種についても同時に可視化する事が出来る。

[結論]

本研究で我々は TLC と MALDI-IMS の手法を融合させた新しいリポドミクス解析手法である、TLC-Blot-MALDI-IMS の手法を確立した。本法は TLC より高感度且つ、各分子種ごとに可視化が可能な解析手法であることから、今後新しいリポドミクス解析手法として幅広く応用されていくものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

脂質は構造が類似した多種類の分子種が生体内に存在していることから解析が遅れていた研究分野である。脂質分析方法として、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (TLC)、核磁気共鳴法および質量分析法 (MS) 等が挙げられる。さらに、脂質分析に用いられる主な MS にはマトリクス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) とエレクトロスプレーイオン化法がある。これら分析法はそれぞれに長所と短所がある。脂質分析方法の一つである TLC は、簡便かつ安価なシステムとして汎用されているが、感度・分離能・同定能が他の分析手法と比べて低いという欠点がある。そこで申請者は、簡便に脂質を分析することのできる TLC と高感度な検出が可能である MS および表面分析法であるイメージングマスマスペクトロメトリー (IMS) とを結合させた新しい脂質分析方法である TLC-Blot-MALDI-IMS を考案し、以下のことを検討した。

①TLC-Blot-MALDI-IMS を用いた脂質分析法の確立

Phosphatidylcholine(PC)を基準に測定した場合、TLC-Blot-MALDI-IMSによる脂質検出の再現性は既存のプリムリン発色法と比較して遜色ないレベルであった。加えて、TLC-Blot-MALDI-IMSを使用すると検出感度が従来のTLCの検出限界を超えて、10倍上昇すること、および比較定量が可能であることを明らかにした。さらにTLCのみでは分離困難であった脂肪酸鎖長の異なる脂質分子種をTLC-Blot-MALDI-IMSによって区別して、同定および比較定量することが可能となった。

②TLC-Blot-MALDI-IMS の応用

ヒト脳の異なる部位から抽出した脂質中の sphingomyelin(SM)をこの TLC-Blot-MALDI-IMS を使って解析すると、SM(d18:1/C24:1)は白質で多く、SM(d18:1/C20:0)は灰白質で多く含有されているという新規知見を得た。

本研究において申請者は TLC-Blot-MALDI-IMS というリポミクス研究の新しい方法を確立し、ヒト材料に応用した。本方法は従来の方法と比較して高感度且つハイスループットであり、今後新しいリポミクス解析方法として幅広く応用されていく可能性があることを審査委員会は高く評価した。また、審査委員会では研究方法論を中心に詳細な質疑が出され、申請者は妥当な回答をした。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 岩下 寿秀

副査 藤本 忠蔵 副査 梅村 和夫